

複数ニューロン活動記録用多重電極の性能評価方法に関する研究

著者	久保 貴嗣
号	14
学位授与番号	455
URL	http://hdl.handle.net/10097/42640

氏名 (本籍地)	久保 貴嗣
学位の種類	博士 (情報科学)
学位記番号	情博第 455 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科、専攻	東北大学大学院情報科学研究科 (博士課程) 応用情報科学専攻
学位論文題目	複数ニューロン活動記録用多重電極の性能評価方法に関する研究
論文審査委員	(主査) 東北大学教授 中尾 光之 東北大学教授 中島 康治 東北大学教授 吉信 達夫 (医工学研究科) 東北大学准教授 片山 統裕

論文内容の要旨

第 1 章 序論 および第 2 章 研究の背景

テトロード (4 重ワイヤー電極) に代表される、複数の記録点を密集して配置した多重電極による細胞外活動電位記録法は、主成分分析や独立成分分析などの信号処理技術と組み合わせることにより、隣接する複数のニューロンの活動を高い時間分解能で同時記録することが可能であるという長所を持つ。脳の情報処理機能は、多数のニューロンの協調的活動によって担われていると考えられているため、この手法は非常に有効である。最近では、シリコンを材料としたマイクロマシン加工技術を応用した様々な多重電極が開発・市販されるようになり、容易に入手できるようになってきた。そのため、脳神経科学の基礎研究のみならず、脳・機械インタフェースなどの応用研究にも利用が広がりつつある。

多重電極を用いて良好な多細胞同時記録データを得るためには、電極の形状や記録点の数、空間的配置など、多数の電極パラメータが記録対象の神経組織に合わせて調節されている必要がある。また電極を脳組織内に埋め込むと、電極の体積の排除効果によって脳組織の一部が圧迫されて死滅するだけでなく、電極周辺の神経組織に機械的ひずみを生じさせ、ニューロンの活動を増強あるいは逆に抑制してしまうことが生じる。その結果、ニューロン活動記録の成績に大きな影響を与えと考えられる。

これまで、電極パラメータの決定は、動物実験による試行錯誤的な方法に頼ってきたため、記録対象に合わせて調節するのは困難であった。すなわち、実験者の経験と勘に頼って決定されることが多かった。また、一般に電極の特性の評価に用いられてきた方法は、電極インピーダンスや、電極留置後に作製した脳標本において測定した損傷領域のサイズなどに限られており、電極の性能を総合的に評価する系統的方法は存在しなかった。

そこで、本研究では、弁別精度のよい多重電極を設計するための新しい方法として、仮想記録実験に基づく電極の評価方法を提案した。さらに、埋め込まれた多重電極によって記録された活動電位波形情報に基づいて、オンサイトでニューロンの位置を推定するとともに、その結果を利用して電極周辺の機械的ひずみに関する情報を取得する方法を開発した。

第 3 章 海馬 CA3 領域の細胞外電位記録、および解析法

麻酔下の SD ラット (3 週齢) より摘出した、厚さ 0.6mm の海馬スライス標本を作成した。標本に電極を刺入し、海馬 CA3 領域の神経細胞の自発活動を記録した。記録電極はフォーク型の 4 極シリコン電極 (4 点/軸×4 軸=16 点) を用いた。記録した信号に遮断周波数 6KHz のローパスフィルタを施し、記録点毎に閾

値を定め、スパイクを検出した。検出したスパイクについて主成分分析に基づくクラスタリングを行い、個々のニューロンに仕分けした。

本実験は東北大学大学院情報科学研究科動物実験委員会の承認の元で実施された。

第4章 細胞外電位記録シミュレータの構築と多重電極パラメータ最適化への応用

1. 本章の目的

多細胞記録の動機を考慮すると、同時記録できるニューロン数が多いほうが望ましい。多細胞記録された信号から神経情報を抽出するためには、スパイク波形を検出し、ニューロンごとに仕分けする作業（スパイク弁別）が必要である。そのためにはパターン識別法が用いられることが多いが、弁別に誤りが生じることは避けられない。弁別の誤りはその後の解析結果に大きな影響を与えるため、これを最小化するように電極を設計することが望ましい。以上のことを考慮し、本章では、弁別精度によって多重電極の特性を評価することを提案するとともに、この指標を用いて電極パラメータを最適化するため新しい方法を構築した。まず、神経組織と多重電極を3次元モデル化し、多細胞記録の仮想実験システムを構築した。このシステムを用いて仮想実験を行い、得られた模擬細胞外電位信号に対し、実際に用いられるスパイク弁別アルゴリズムを適用した。模擬実験ではどのニューロンがいつ活動電位を発生したかを完全に把握することができるので、そのデータとスパイク弁別結果を比較することにより、弁別精度を定量化した。

2. シミュレーション、および解析方法

本研究では海馬 CA3 領域の錐体細胞層をモデル化した¹⁾。この領域は細胞密度が高いために多重電極記録に適している。さらに細胞組織の構造が単純で均質であるため、モデル化が比較的容易であるためである。神経組織モデルの形態は幅 0.5mm、奥行き 0.1mm、厚さ 0.6mm の直方体とした。ニューロンは細胞体のみを持つ直径 20 μ m の球体としてモデル化し、これを直方体の中に互いに重ならないようにランダムに配置した（図 1）。ニューロンの密度は解剖学的研究および生理学的研究報告に基づいて決定した。

神経組織内に電極を刺入したとき、一つの記録点で複数のニューロンのスパイク波形が観測される。本研究では、ニューロンのスパイク波形が線形重畳されたものであると仮定し、モデル化を行った。スパイク波形の振幅はニューロンと電極があまり近接していないときは、ニューロンを点信号原と見ることができるので、細胞体と記録点との距離の関数で近似した²⁾³⁾。背景ノイズは実験的に得たデータに自己回帰モデルを当てはめることにより記述した。例として、1つの記録点で6つのニューロンの活動記録を模擬したときの細胞外電位を図 1B~C に示す。神経組織はバースト型ニューロンと非バースト型ニューロンによって構成されているとし、バースト型ニューロンの割合に従ってこのニューロンの個数を決めた。バースト型ニューロンは、約 5ms 間隔で発生し徐々に振幅が減衰する 4 連発のスパイク（バースト）を活動単位とし（図 1C）、その発生確率がポアソン仮定に従うと仮定した。バースト活動中に新たにバースト活動が始まることはないようにした。非バースト型ニューロンは、ポアソン過程に従う単発のスパイクを発生するとした。活動電位波形は実験で得られた平均スパイク波形をテンプレートとして用いた。ニューロンの平均発火頻度を与えた。モデルパラメータは実験データに基づいて決定した。電極を神経組織に刺入した際の侵襲特性は、電極周辺にキルゾーンを設け、その内部にあるニューロンを不活性化する

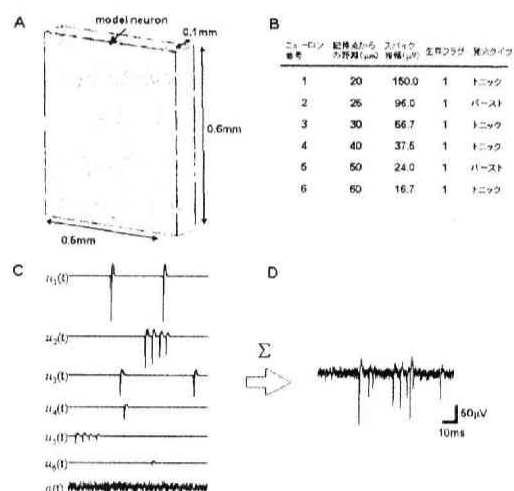


図 1: A: 3 次元神経組織モデル、幅 0.5 mm、奥行き 0.1 mm、厚さ 0.6 mm の直方体の中にモデルニューロン（矢印）が分布している。B: 6 個のニューロンで構成された神経組織における活動電位記録シミュレーションのためのパラメータ。C: 各ニューロンの活動電位と背景ノイズの時系列。D: 模擬細胞外電位の計算結果。

スパイクを発生するとした。活動電位波形は実験で得られた平均スパイク波形をテンプレートとして用いた。ニューロンの平均発火頻度を与えた。モデルパラメータは実験データに基づいて決定した。電極を神経組織に刺入した際の侵襲特性は、電極周辺にキルゾーンを設け、その内部にあるニューロンを不活性化する

ことによってモデル化した。

3. 結果

4 つの記録点を持つシリコン電極において、記録点の空間配置が記録信号の性質、特にスパイク弁別制度に及ぼす影響を検討した。電極モデルは、記録点を菱形に配置し、記録点間隔を 15, 25, 35 および 40 μm としたもの (DIA15, 25, 35, 40) と、記録点を正方形に配置し間隔を 25 μm としたもの (SQ25) を用意した (図 2)。

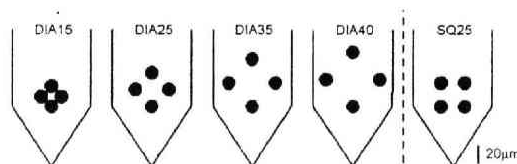


図 2: 仮想記録実験で用いた 5 種類の電極モデル

神経組織モデル内部の 24 点を選び、5 種類の電極モデルを配置し、仮想実験およびデータ解析を行った。なお、電極の挿入位置が異なるときに同一のニューロンの活動が記録されていないことを確認した。さらに仮想実験に用いたすべてのニューロンの活動パターンと背景ノイズ波形は完全に同一とし、電極の記録点配置および刺入位置のみ異なるようにした。記録点を菱形配置にした場合では、記録可能なニューロン数、偽陰性率はいずれも記録点間距離に対する依存性がみられた (Friedman test, $P < 0.01$)。ニューロン数は記録点間隔を広くするほど増える傾向があった。記録点を離すことにより、それぞれが別のニューロンを記録できるようになるためであると考えられる。偽陰性率は DIA25~35 付近で最小値をとることがわかった。偽陽性率については記録点間隔への依存性はみられなかった。以上の結果から、菱形配置にした場合は記録点間距離を 25~35 μm にするのが適切であることが示唆された。記録点を正方形に配置した場合 (SQ25) の成績は菱形配置したもの (DIA25) の間に統計的に有意な差が認められなかった (Wilcoxon test, $P < 0.05$)。以上の結果から、記録点を菱形に配置した場合、記録点間隔を 25~35 μm 程度にするのが適切であることが示唆された。

第 5 章 3 次元細胞位置推定法を用いた神経組織ひずみの推定

1. 本章の目的

従来、脳に電極を刺入したことによって生じる神経組織へのダメージの評価法として、組織学的方法と電気生理学的方法が用いられてきた。組織学的方法ではダメージの様子を 3 次元的な情報として得ることができるが、組織を摘出して顕微鏡で観察する必要があるため、記録中に情報が得られない。一方、電気生理学的方法では、ダメージの様子を 3 次元的な情報として得ることができないという問題があった。

本章では、神経組織に埋め込まれた多重電極で多点記録された活動電位の波形情報から、記録しているニューロンの相対的な位置を推定する方法を提案した。さらに位置推定の結果を基に、電極を微小移動させたときのニューロンの相対的な位置変化を調べることにより、神経組織へのダメージの主要因である機械的ひずみを視覚化する方法を開発した。

2. 細胞外活動電位の多点記録に基づいたニューロンの 3 次元位置推定法⁴⁾

記録点とニューロンがあまり近接していないときは、細胞外活動電位の振幅がニューロン-記録点間の距離を変数とする関数 (振幅-距離関数) で近似できることが報告されている²⁾³⁾。シリコン電極のように、記録点の位置が把握可能な多重電極を用いれば、ニューロンの位置を仮定したとき、各記録点とニューロンまでの距離と振幅-距離関数から、各記録点で測定される振幅を計算することができる。そこで、多点記録された細胞外活動電位の振幅と、計算された振幅の差の 2 乗和をコスト関数とし、そのコスト関数を最小化することによりニューロンの位置を推定した。コスト関数の最小化は準ニュートン法を用いた。

3. 結果

神経組織に機械的ひずみを生じさせるために、電極を 5 分毎に 30 μm ずつ深さ 210 μm まで進めながら多細胞記録を行った。電極が静止している時間帯を記録セッション (S00~S14) として、各セッションで観測された波形パターンの類似度に基づいて同一ニューロンと推定されたニューロンの位置推定を行った (図 3)。このニューロンの活動は、神経組織内のある点を基準点としたとき、そこから電極を 90 μm 下方に進めたときに明瞭に弁別可能なスパイク波形として観測された (図 3A, S03)。電極を深さ 210 μm まで進め、その後、深さ 0 μm まで戻す間、継続してニューロン活動が記録することができた。その結果、電極

を軸に対して平行に先端方向に微小移動させると、ニューロンの相対位置が電極の移動とほぼ平行かつ逆方向に移動する様子が観察された。図3において、記録セッション S03～S07 の間に電極を 120 μm 進めたのに対し、ニューロンの相対位置の変化は 50 μm 程度に過ぎなかった。また記録セッション S07 から S10～S14 の間に電極を 90 μm 引き抜いたのにも関わらず、ニューロンの相対位置はまったく変化しなかった。電極の移動距離とニューロンの移動距離の不一致は、電極の移動によって組織に生じた機械的ひずみを反映している可能性が示唆される。

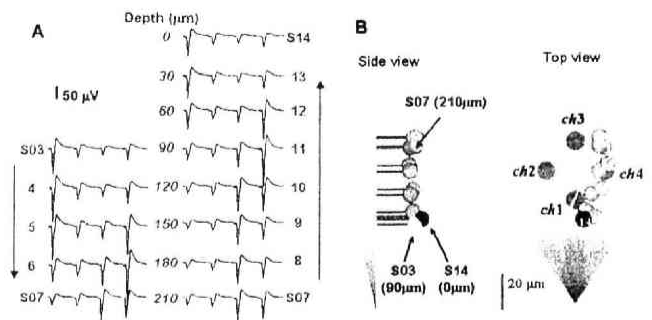


図 3: 電極を微小に移動させたときのニューロンの追跡結果。A: 各記録点で記録した平均スパイク波形の変化。B: ニューロンの位置推定の結果。電極を基準とした相対的位置で表現した。

第 6 章 結論

多細胞同時記録用多重電極の設計、および性能を総合的に評価するために、3次元モデルを用いた多細胞記録の仮想記録実験法を提案した。また、神経組織へのダメージの主要因である機械的ひずみを視覚化するために、ニューロンの位置推定法を用いる手法を考案した。

仮想記録実験では、ケーススタディとして、ラットの海馬 CA3 領域の複数ニューロン活動を記録し、主成分分析法によってスパイク弁別を行う場合について、最適な電極間隔の評価を行い、その有用性を示した。今後は、神経組織モデルおよび電極モデルを改良・発展させることにより、シミュレーション精度の向上と応用範囲の拡張を図り、実際の多重電極の設計に供したい。

ニューロンの位置推定法を用いて神経組織の機械的ひずみを視覚化することによって、ニューロンが電極に引きずられたり、巻き込まれたりする様子を観察することが可能になった。本手法は顕微鏡観察によらず、埋め込まれた多重電極で記録された信号波形から組織ひずみの状態をオンサイトで評価できるため、顕微鏡観察が困難な *in vivo* 記録に適用可能であるという特長がある。今後は、ニューロンの追跡方法の改良や位置推定結果の実験的検証を行うことにより、本手法の信頼性を高めるとともに、*in vivo* 記録データへ適用することにより有用性を示していく必要がある。

文献

- 1) 久保貴嗣, 片山統裕, 辛島彰洋, 中尾光之: 生体医工学. **46** 675 (2008)
- 2) I. Cohen and R. Miles: J. Physiol. **524** 485 (2000)
- 3) C. M. Hempel, K. Sugino, S. B. Nelson: J. Neurosci Methods. **120** 121 (2002)
- 4) T. Kubo, N. Katayama, A. Karashima, M. Nakao: IEEE EMBS. 5021 (2008)

論文審査結果の要旨

脳に刺入する多重電極を用いた多細胞記録法は、非侵襲的な脳活動記録法に比して、多くの神経情報を取得できるという特長がある。しかし、記録される神経信号の質が電極形状などの多数のパラメータに強く依存するため、パラメータの最適化が必要である。また、電極埋め込みによって脳組織に生じる機械的ひずみなどの定量評価が必要である。しかしながら、これらの特性評価には多くの実験を要するなど非常にコストがかかることから、実際には、多くを研究者の経験と勘に頼らざるを得ないという問題があった。そこで著者は、多重電極によって記録される神経信号を再現できる仮想実験システムを用いた電極特性の評価法、および、記録された神経信号を解析することによって電極周辺の脳組織の状態を刺入された状態（オンサイト）で可視化するための手法を提案し、その有用性を詳細に検討した。本論文は、その成果をまとめたもので、全編6章からなる。

第1章は序論である。

第2章では、現時点で利用可能な脳刺入型多重電極と従来から用いられてきた電極特性の評価法をまとめるとともに、その問題点を整理している。

第3章では、本研究で行った神経生理実験とデータ解析の方法をまとめている。

第4章では、まず、神経生理学・解剖学的知見に基づいたラット海馬組織の3次元モデルを構築すると共に、多重電極と電極埋め込みの組織への影響をモデル化している。これらのモデルを用いた仮想多細胞記録実験によって得られる神経情報の推定精度を定量化している。さらに、推定された神経情報を基に電極特性を評価する手法を提案し、その有用性を確認している。従来、動物実験でしか行えなかった電極の特性評価をコンピュータシミュレーションにより一部代替できることを初めて示した結果であり、評価できる。

第5章では、脳に埋め込まれた多重電極で記録された神経活動電位の波形を解析することによって、ニューロンの3次元位置を推定する方法を提案している。さらに、これを実験データに適用することにより、電極周辺の組織ひずみの状態を可視化する方法を与えている。従来、神経組織ひずみの状態を知るためには、神経組織を摘出して組織学的解析を行う必要があったのに対し、提案法では電極を留置した状態でその情報が得られるため、臨床的にも有用であり、高く評価できる。

第6章は結論である。

以上要するに本論文は、脳刺入型多重電極の設計・性能評価に関し、神経科学の知見に基づく仮想多細胞活動記録システムの構築と電極パラメータ最適化法への応用、および、多重電極で記録された信号解析に基づく神経組織ひずみのオンサイト推定法を与えたもので、応用情報科学ならびに神経工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として合格と認める。